

⑫ 公開特許公報(A) 平2-242144

⑤Int.Cl.⁵G 01 N 23/223
C 12 Q 1/68

識別記号

庁内整理番号

7172-2G
A 6807-4B

④公開 平成2年(1990)9月26日

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全8頁)

⑤④発明の名称 標的物質の存在位置決定方法及び装置

②①特 願 平1-62091

②②出 願 平1(1989)3月16日

⑦②発 明 者 鴫 田 二 郎 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑦②発 明 者 永 井 啓 一 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑦②発 明 者 篠 村 知 子 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

⑦①出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

⑦④代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

標的物質の存在位置決定方法及び装置

2. 特許請求の範囲

1. 標的物質に特異的に結合する物質を生体試料に結合させ、その結合位置を検出することにより、標的物質の存在位置を決定する方法において、前記標的物質に特異的に結合する物質を標識物質で標識し、前記標識物質の存在位置を波長0.1Å～100Åの電磁波の吸収又は前記電磁波の蛍光で検出することを特徴とする標的物質の存在位置決定方法。
2. 標的物質がDNAまたはRNAであり、標的物質に特異的に結合する物質が前記標的物質のDNA又はRNAに相補的な塩基配列を持つDNA又はRNAであることを特徴とする請求項1記載の標的物質の存在位置決定方法。
3. 請求項2記載の標的物質の存在位置決定方法において、標的物質のDNAが染色体中の遺伝子であり、前記標的物質のDNAに相補的な塩

基配列を持つDNAが、前記遺伝子全体又はその1部、あるいは前記遺伝子のcDNAであることを特徴とする染色体上の遺伝子位置決定方法。

4. 請求項2記載の標的物質の存在位置決定方法において、標的物質のDNAが染色体中のDNAであり、前記標的物質のDNAに相補的な塩基配列を持つDNAが前記染色体上の由来位置が未知であるDNA断片であることを特徴とする染色体上のDNA断片由来位置決定方法。
5. 標的物質が抗原又はハプテンであり、標的物質に特異的に結合する物質が前記標的物質の抗原又はハプテンに特異的に結合する抗体であることを特徴とする請求項1記載の標的物質の存在位置決定方法。
6. 標的物質の存在位置の決定を生体試料が含水状態のままで行うことを特徴とする請求項1乃至請求項5のいずれかの項記載の標的物質の存在位置決定方法。
7. 標識物質が原子番号13以上の元素であること

を特徴とする請求項1乃至請求項6のいずれかの項記載の標的物質の存在位置決定方法。

8. 標識物質が金、銀、コバルト、鉄、ニッケル、水銀及びフェリチンの中のいずれかであることを特徴とする請求項7記載の標的物質の存在位置決定方法。

9. 標識物質により標識されている、標的物質に特異的に結合する物質を結合させた生体試料上の標識位置を検出することにより、前記標的物質の存在位置を決定する装置において、波長0.1Å～100Åの電磁波源と、前記生体試料の直後に密着して置かれる二次元電磁波検出器とを具備することを特徴とする標的物質の存在位置決定装置。

10. 標識物質により標識されている、標的物質に特異的に結合する物質を結合させた生体試料上の標識位置を検出することにより、前記標的物質の存在位置を決定する装置において、波長0.1Å～100Åの電磁波源と、前記電磁波を集光する光学系と、前記生体試料を保持し、二次

元に走査する機構と、電磁波検出装置とを具備することを特徴とする標的物質の存在位置決定装置。

11. 標識物質により標識されている、標的物質に特異的に結合する物質を結合させた生体試料上の標識位置を検出することにより、前記標的物質の存在位置を決定する装置において、波長0.1Å～100Åの電磁波源と、生体試料保持具と、前記電磁波を拡大結像する電磁波光学系と、二次元電磁波検出器とを具備することを特徴とする標的物質の存在位置決定装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は生体試料中の標的物質の存在位置を高分解能で決定する方法及び装置に関し、特に染色体上の標的遺伝子位置を高分解能で決定する方法及び装置に関する。

(従来の技術)

従来、生体試料中の標的物質の存在位置を決定する方法としては、蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡

法が、また、特に染色体上の標的遺伝子の位置を決定する方法としては、in-situ ハイブリダイゼーション法が用いられてきた。

蛍光抗体法は、例えば統生物物理学講座5、生物学的技術Ⅱ、吉岡書店(1968年)、342頁から351頁に記載されているように、標的物質に特異的に結合する抗体を蛍光色素で標識し、これを生体試料と反応、結合させた後、標識からの蛍光を光学顕微鏡で検出して、標的物質の存在位置を決定する方法である。また、免疫電子顕微鏡法は、例えばぶんせき1987年10月号、705頁から708頁に記載されているように、標的物質に特異的に結合する抗体を金コロイド等で標識し、これを生体試料と反応、結合させた後、その結合位置を電子顕微鏡で検出し、標的物質の存在位置を決定する方法である。さらに、in-situ ハイブリダイゼーション法は、例えば臨床検査30巻、11号(1987年)1296頁から1302頁に記載されているように、標的遺伝子に相補的な塩基配列を持ち、³H等のラジオアイソトープで標識したDNA断片(DNAプロー

ブ)を染色体試料と反応、対合させた後、その対合位置をラジオアイソトープからの放射線を写真乳材で検出すること(オートラジオグラフィー)により検出し、標的遺伝子の存在位置を決定する方法である。

(発明が解決しようとする課題)

上記の蛍光抗体法は、変形の少ない含水状態のままの生体試料を用いて、標的物質の存在位置を決定できるが、検出に可視光を用いているため、その空間分解能は可視光の波長と同程度(約0.4μm)以上にはできないという問題点があった。

また、上記の免疫電子顕微鏡法は、検出に電子顕微鏡を用いるため、検出分解能は高いが、変形の少ない含水試料を用いることができず、包埋等の複雑で困難な試料の前処理が必要であるという問題点があった。

さらに、上記のin-situ ハイブリダイゼーション法は、標的遺伝子の位置を染色体上に直接決定できるが、検出にオートラジオグラフィーを用いているために空間分解能が悪く(染色体の染色稿

の巾と同程度で約 $0.4\mu\text{m}$ 以上)、また検出に長時間を要す(約1ヶ月)という問題点があった。

本発明の目的は、包埋等の複雑で困難な試料の前処理を必要とせず、変形の少ない含水状態の生体試料を用いることができ、蛍光抗体法より空間分解能の高い標的物質の存在位置決定方法及び装置を提供することであり、特に、高分解能の染色体上の遺伝子位置決定方法及び装置を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

上記目的を達成するために、本発明では標的物質に特異的に結合する物質、例えば相補的塩基配列を持つ核酸又は抗体を標識物質で標識し、その標識の位置を波長 $0.1\text{\AA}\sim 100\text{\AA}$ 電磁波の吸収又は前記電磁波の蛍光で検出することにより、標的物質の存在位置を決定するようにした。

即ち、本発明の標的物質の存在位置決定方法は標的物質に特異的に結合する物質を生体試料に結合させ、その結合位置を検出することにより、標的物質の存在位置を決定する方法において、前記

が前記染色体上の由来位置が未知であるDNA断片である場合の染色体上のDNA断片由来位置決定方法にも有用である。

さらに、標的物質が抗原又はハプテンであり、標的物質に特異的に結合する物質が前記標的物質の抗原又はハプテンに特異的に結合する抗体である場合にも本発明方法は適用できる。

本発明方法において、標識物質の存在位置を検出するのに使用する電磁波は波長 $0.1\text{\AA}\sim 100\text{\AA}$ のもので、通常X線と呼ばれているものであり、これを利用する顕微鏡はX線顕微鏡といわれている。

本発明方法において、標的物質に特異的に結合する物質を標識する標識物質としては、X線との相互作用が大きくX線顕微鏡により生体試料と区別して検出しうるものであればよいが、原子番号13以上の重元素を標識に用いるのが好ましい。具体的には、金、銀、コバルト、鉄、ニッケル、水銀及びフェリチン等が挙げられる。

本発明は、また、上記遺伝子位置決定方法に使用する標的物質の存在位置決定装置に係り、この

標的物質に特異的に結合する物質を標識物質で標識し、前記標識物質の存在位置を波長 $0.1\text{\AA}\sim 100\text{\AA}$ の電磁波の吸収又は前記電磁波の蛍光で検出することを特徴とする。そして、この標的物質の存在位置決定法は生体試料が含水状態のまま行うことができる。

また、標識物質としては金、銀、コバルト、鉄、ニッケル、水銀及びフェリチンの中のいずれかであるのが好ましい。

本発明方法が適用できるのは、標的物質がDNAまたはRNAであり、標的物質に特異的に結合する物質が前記DNAまたはRNAに相補的な塩基配列を持つDNAまたはRNAである場合が挙げられ、特に、標的物質のDNAが染色体中の遺伝子であり、標的物質のDNAに相補的な塩基配列をもつDNAが前記遺伝子全体又はその一部、あるいは前記遺伝子のcDNAである場合の染色体上の遺伝子位置決定方法に有用である。また、標的物質のDNAが染色体中のDNAであり、標的物質のDNAに相補的な塩基配列をもつDNA

装置は、標識物質により標識されている、標的物質に特異的に結合する物質を結合させた生体試料上の標識位置を検出することにより、前記標的物質の存在位置を決定する装置において、波長 $0.1\text{\AA}\sim 100\text{\AA}$ の電磁波源と、前記生体試料の直後に密着して置かれる二次元電磁波検出器とを具備することを特徴とする標的物質の存在位置決定装置であり。また、この装置は、標識物質により標識されている、標的物質に特異的に結合する物質を結合させた生体試料上の標識位置を検出することにより、前記標的物質の存在位置を決定する装置において、波長 $0.1\text{\AA}\sim 100\text{\AA}$ の電磁波源と、前記電磁波を集光する光学系と、前記生体試料を保持し、前記電磁波の入射方向に垂直な面内で二次元に走査する機構と、電磁波検出装置とを順に配設したことを特徴とする標的物質の存在位置決定装置である。更にこの装置は、標識物質により標識されている、標的物質に特異的に結合する物質を結合させた生体試料上の標識位置を検出することにより、前記標的物質の存在位置を決定する装

置において、波長 $0.1\text{\AA}\sim 100\text{\AA}$ の電磁波源と、生体試料保持具と、前記電磁波を拡大結像する電磁波光学系と、二次元電磁波検出器とを順に配設したことを特徴とする標的物質の存在位置決定装置である。

(作用)

X線顕微鏡は、使用する電磁波の波長が $0.1\text{\AA}\sim 100\text{\AA}$ 程度であり、光学顕微鏡で使用する $3800\text{\AA}\sim 8000\text{\AA}$ に比べて短かいので、原理的に空間分解能が高く、標識の位置を高分解能で検出できる。また、X線は透過力が強いので、電子顕微鏡のように試料を真空中に置く必要がない。したがって、包埋等の複雑で困難な試料の前処理は不要であり、変形の少ない含水状態の生体試料を用いることが可能である。含水状態の生体試料を用いれば、脱水等の前処理による変形を少なくでき、自然状態の試料において標的物質の存在位置を決定できる。

重元素を標識に用いた場合、軽元素標識に比べて、X線吸収係数やX線蛍光の収率が大きいので、X線顕微鏡により高感度で検出できる。また、生

体試料はほとんどが軽元素でできているので、重元素標識は、X線顕微鏡により、生体試料と区別して検出できる。

(実施例)

以下、本発明の一実施例を、染色体上の遺伝子位置決定を例に、第1図及び第2図を用いて説明する。

まず、培養中の白血球を最終濃度 $0.5\times 10^{-6}\sim 1.0\times 10^{-6}\text{M}$ のコルヒチンで約6時間処理して分裂中期細胞を蓄積する。次に、この白血球をホモジェナイザーで機械的に破壊するか、Nonidet P-40等の非イオン性界面活性剤で処理して破壊し、遠心操作によって染色体のみを分離して取り出す。さらに、この染色体をRNaseで処理して染色体に含まれるRNAを分解した後、70%ホルムアミドで 70°C 、1.5分処理して染色体DNAを変性させ、二本鎖DNAを一本鎖にする。

一方、染色体上での位置を決定したい標的遺伝子と相補的な塩基配列を持つDNA又はRNAを用意する。このようなものとしては、イントロン

を含む標的遺伝子全体又はその一部、あるいは標的遺伝子のcDNA (complementary DNA) などがあるが、ここではcDNAを用いた場合について説明する。まず、標的遺伝子のcDNAに、市販の試薬キット(例えば、Nick translation reagent kit (BRL, Cat. No. 8160SB), Biotin-11-dUTP (BRL, Cat. No. 9507SA))とそのプロトコルを用いてニックトランスレーション反応を行ない、核酸塩基のチミン(T)をビオチンを共有結合した核酸塩基のウラシル(U)に置換し、cDNAをビオチンで予備標識し、DNAプローブとする。

予備標識したcDNAは 95°C で10分間熱処理して変性させ、1本鎖にした後、ハイブリダイゼーション溶液(300mM NaCl, 30mM クエン酸ナトリウム, 50%ホルムアミド, 10%硫酸デキストラン, 0.02%牛血清アルブミン, 0.02%フィコール, 0.02%ポリビニルピロリドン, 0.05M リン酸ナトリウム緩衝液, $200\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNA)中で、変性した染色体と 30°C 、15時間反応させ、cDNA染色体上の標的遺伝子に特異的に対合させる。

次に、標識物である直径 $5\sim 50\text{nm}$ 程度のコロイドを結合させたアビジン又はストレプトアビジンを染色体試料に加えて室温で約10分間インキュベートし、染色体上に結合しているcDNAのビオチンに、アビジンを介してコロイドを特異的に結合させて本標識を行なう。反応終了後、緩衝液(0.1M トリス塩酸(pH7.5), 0.15M NaCl)で15分間、2回洗浄し、反応しなかったコロイドを取り除く。なお、本標識の方法としては、コロイドを結合させた抗ビオチン抗体をcDNAのビオチンに直接結合させてもよいし、抗ビオチン抗体(1次抗体)をcDNAのビオチンに結合させた後、さらにコロイドを結合させた1次抗体に対する抗体(2次抗体)を結合させるという2ステップの方法を用いてもよい。また、ここではX線吸収係数が大きく、検出感度を高くできるコロイドを標識として用いたが、このほかに銀コロイドや鉄、コバルト、ニッケル、水銀等の金属や鉄を含むタンパク質フェリチン、一般的にはX線との相互作用の大きい原子番号13以上の重元素を標識と

して用いるのが好ましい。ただし、標識物により X 線の吸収率、X 線の蛍光の収率の大きさとその X 線波長依存性が異なるため、標識物の大きさと、これを検出する X 線波長を最適化する必要がある。

以上により染色体標本が調製できたので、次に染色体上に結合した金コロイド標識の位置を含水状態のまま X 線顕微鏡で高分解能で検出する。

第 2 図(a)は標識位置の検出に用いる X 線顕微鏡の一例を示した図である。まず、X 線源 9 から標識物質の X 線吸収率が十分に大きい波長領域の X 線 10 を取り出す。本実施例では、標識物質として金コロイドを用いており、金の X 線吸収率は 40 Å 付近で最大となるので、波長 20~70 Å 程度の X 線が好ましい。そこで、X 線源として炭素を陰極材料とする回転対陰極型 X 線発生装置を用い、これから炭素の発する特性 X 線（炭素 K α 線、44.8 Å）を取り出して用いた。なお、この他の X 線源としては、非常に強力な X 線源として知られている S O R (Synchrotron Orbital Radiation) 光等を利用できるが、このような連続 X 線を発生する X 線

源を用いる場合には、結晶モノクロメータ等で分光し、特定波長領域の X 線を取り出すことが好ましい。染色体試料 12 を含水状態に保つため大気圧の空気又はヘリウムが充たされている試料室 15 と真空に保たれている X 線源 9 とは、吸収による X 線のロスの少ないポリイミド等の薄膜 11 によって隔てられている。シリコンウエハやガラス板等の基盤 14 上に塗布された P M M A（ポリメチルメタクリレート）等のレジスト 13 は、高分解能の二次元 X 線検出器としての役割を果たし、染色体試料 12 はこの上に密着して保持されている。

以上のような密着型の X 線顕微鏡を用いて、約 1 J/cm² 程度の X 線を染色体試料 12 及びレジスト 13 に照射した後、このレジストを M I B K（メチルイソブチルケトン）と I P A（イソプロピルアルコール）を 1:3 から 1:5 程度の混合比で含む現像液で現像すると、X 線照射量に応じてレジスト膜厚が減少する。この結果、第 2 図(b)に示すように、X 線吸収量の最も大きい金コロイドが存在した位置では X 線照射量が最も少なく、残存する

レジスト膜厚が最も厚く、DNA やタンパク質を含む染色体が存在した場所ではこれに次いでレジスト膜厚が厚く、何も存在しなかった場所では最もレジスト膜厚が薄くなる。したがって、現像後のレジストを走査型顕微鏡等で観察することにより染色体の輪郭と共に金コロイドの存在位置を検出でき、これらをもとに染色体上の標的遺伝子の存在位置を 100nm 以下の高分解能で決定できる。

ここまでは、標的遺伝子の位置と染色体の輪郭のみから染色体上の標的遺伝子位置を決定する例について述べてきたが、自然の状態においても染色体の輪郭は変形していることがあり、十分な染色体上の標的遺伝子位置決定精度が得られないこともある。そのような場合には、標的遺伝子だけでなく、標的遺伝子と同一染色体上にあり、その位置が既知の基準となる遺伝子についても同時に位置決定を行ない、この基準遺伝子の位置をもとにして染色体上の標的遺伝子位置を決定することにより、高い位置決定精度を得ることができる。第 1 図及び第 2 図では、2 つの基準遺伝子を用い

た例を示してある。

次に、本発明の第 2 の実施例を第 3 図を用いて説明する。本実施例が前記実施例と異なる点は、密着型 X 線顕微鏡の代わりに走査型 X 線顕微鏡を用いている点にあり、染色体試料の調製法等は同一であるので説明は省略する。

X 線源 9 から単色化した X 線 10 を取り出し、フレネルゾーンプレート 17 で集光して染色体試料 12 上に X 線のスポットを作る。染色体試料 12 はポリイミド等の X 線吸収の少ない薄膜 18 上に保持されており、この薄膜の外縁部はまた、X 線光軸と垂直な面内を二次元走査できる二次元走査機構 19 に保持されている。染色体試料 12 の後ろには X 線検出器 20 が配置され、透過してくる X 線量を計測できるようになっており、この出力はデータ処理装置 21 に送られるようになっている。X 線源 9 及びフレネルゾーンプレート 17 は真空中に置かれているため、大気圧の空気又はヘリウムで充たされている試料室 15 との間は、やはりポリイミド等の X 線吸収の少ない薄膜 11 で仕切っている。

以上のような走査型X線顕微鏡を用い、二次元走査機構19で染色体試料12を二次元走査し、透過してくるX線量をX線検出器20で計測した後、さらにそのデータをデータ処理装置21で処理することにより、染色体試料12のX線吸収量に基づく二次元画像を得ることができる。したがって、この二次元画像をもとに、前記実施例と同様に標的遺伝子の染色体上の存在位置を高分解能で決定できる。

以上は、染色体試料12のX線吸収量を計測する場合について述べたが、X線検出器20を試料の後方ではなく、側面前方又は側面後方に置くことにより、X線蛍光量を計測することもでき、同様の結果が得られる。そして、特に、X線検出器20を試料の側面前方に置く場合には、薄膜18が不要となり、試料を直接二次元走査機構19に保持できるという利点がある。

また、本実施例の場合には、X線光軸と染色体試料の保持平面の成す角度が異なる2種類以上の二次元画像を撮ることにより、ステレオ画像を得

る。X線源9は真空中に置かれているため、大気圧の空気又はヘリウムで充たされている試料室15との間はやはりポリイミド等のX線吸収の少ない薄膜11で仕切っている。

以上のような拡大結像型のX線顕微鏡を用いることにより、やはり染色体試料12のX線吸収量を反映した二次元画像を得ることができる。したがって、この二次元画像をもとに、前記2つの実施例と同様、標的遺伝子の染色体上の存在位置を高分解能で決定できる。

なお、本実施例の場合にも、前記2番目の実施例の場合と同様に、X線光軸と染色体試料の保持平面の成す角度が異なる2種類以上の二次元画像を撮ることにより、ステレオ画像を得ることができる。したがって、前記1番目の実施例では得られなかったX線光軸方向、すなわち染色体試料の厚み方向の分解能を得ることができるため、標的遺伝子の染色体上の存在位置を、さらに高分解能で決定できるという利点がある。

以上、3つの異なるタイプのX線顕微鏡を用い

ることができる。したがって、前記実施例では得られなかったX線光軸方向、すなわち染色体試料の厚み方向の分解能を得ることができるため、標的遺伝子の染色体上の存在位置をさらに高分解能で決定できるという利点がある。

さらに、本発明の第3の実施例を第4図を用いて説明する。本実施例が前記2つの実施例と異なる点は、X線顕微鏡として拡大結像型X線顕微鏡を用いている点にあり、染色体試料の調製法等は同一であるので説明は省略する。

X線源9からは単色化したX線10を取り出し、染色体試料12に照射する。染色体試料12はポリイミド等のX線吸収の少ない薄膜18上に保持されており、この薄膜の外縁部はまた、試料保持用治具22によって保持されている。染色体試料12の後方には、拡大結像用のフレネルゾーンプレート23が配置されており、染色体試料12からのX線はチャンネルプレート等の二次元X線検出器24上に拡大結像される。二次元X線検出器24の出力はデータ処理装置21に送られて処理されるようになってい

て、標的遺伝子の染色体上の存在位置を決定する場合の実施例を説明したが、これら3つの方法は、標的遺伝子を未知DNA断片に置き換えることにより、未知DNA断片が染色体上のどの位置に由来するものであるかを決定することにも用いることができる。例えば、ヒトゲノムライブラリ中には、24種類の染色体に由来するDNA断片が多数含まれているが、各々のDNA断片の由来する染色体及びその染色体上の由来位置は不明である。したがって、このようなDNA断片の由来する染色体及びその染色体上の由来位置を、上記の3つの方法で決定し、既存の遺伝子位置を示した地図(遺伝子マップ)と照合することにより、そのDNA断片が、時間と労力を要する塩基配列決定等の詳細な解析に値するか否かを事前に判断でき、ヒトゲノムライブラリを用いた遺伝子の解析に要する時間と労力を節約できるという効果がある。

また、以上に述べた例はすべて、生体試料中の遺伝子等のDNAが標的物質であり、この標的DNAに特異的に結合する物質は標的DNAと相補

的な塩基配列を持つDNAまたはRNAであった。しかし、標的物質をタンパク質等の抗原又はハプテンとし、この標的物質に特異的に結合する物質をこれらに特異的に結合する抗体とすることにより、上記の3つの方法は、生体試料中の抗原又はハプテンの存在位置を高分解能で決定する方法として用いることができる。

〔発明の効果〕

本発明では、標的物質に特異的に結合する物質を標識物質で標識し、その標識の位置をX線顕微鏡で検出するようにしたため、包埋等の複雑で困難な試料の前処理を必要とせず、変形の少ない含水状態の生体試料を用いることができ、標的物質の存在位置を例えば100nm以下の高分解能で決定できる。

4. 図面の簡単な説明

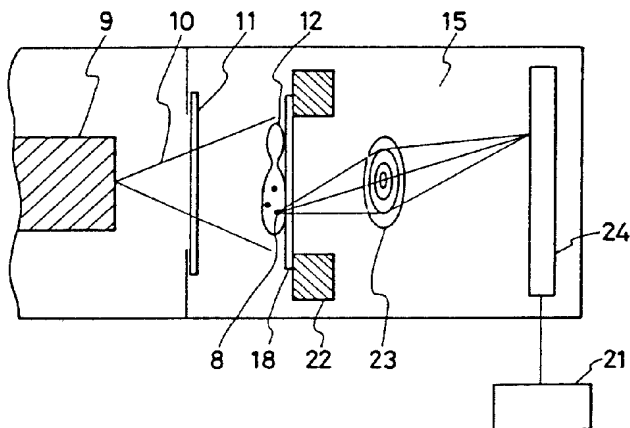
第1図は本発明の三つの実施例に共通の染色体試料調製法の流れ図、第2図(a)は本発明の第一の実施例で用いたX線顕微鏡の模式図、第2図(b)は現像後のレジスト及び基盤の断面の模式図、第3

図は本発明の第二の実施例で用いたX線顕微鏡の模式図、第4図は本発明の第三の実施例で用いたX線顕微鏡の模式図である。

1…染色体、2…変性した染色体、3…標的遺伝子cDNA、4…基準遺伝子cDNA、5…ビオチンで予備標識した標的遺伝子cDNA、6…ビオチンで予備標識した基準遺伝子cDNA、7…金コロイドで本標識した染色体、8…金コロイド、9…X線源、10…X線、11…薄膜、12…染色体試料、13…レジスト、14…基盤、15…試料室、16…現像後のレジスト、17…フレネルゾーンプレート、18…薄膜、19…二次元走査機構、20…X線検出器、21…データ処理装置、22…試料保持用持具、23…フレネルゾーンプレート、24…二次元X線検出器。

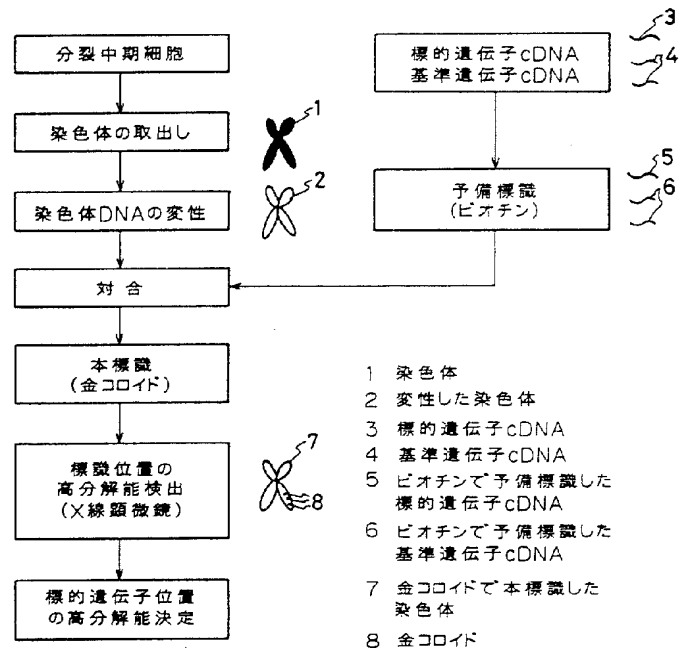
出願人 株式会社日立製作所
代理人 弁理士 平 木 祐 輔
同 弁理士 石 井 貞 次

第 4 図

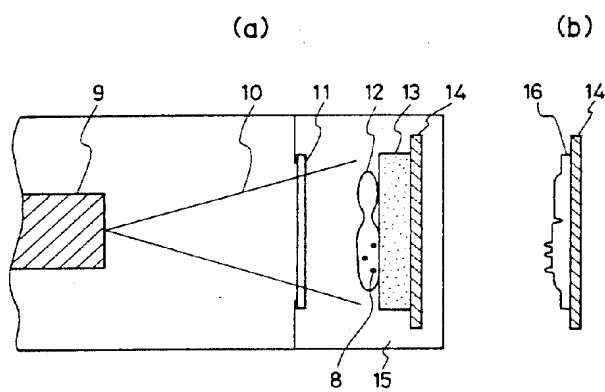


- 18 薄膜
- 21 データ処理装置
- 22 試料保持具
- 23 フレネルゾーンプレート
- 24 二次元X線検出器

第 1 図

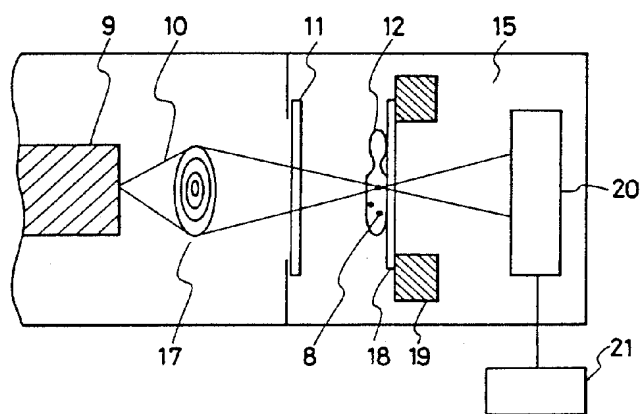


第 2 図



- | | | |
|---------|----------|-------------|
| 8 金コロイド | 11 薄膜 | 14 基盤 |
| 9 X線源 | 12 染色体試料 | 15 試料室 |
| 10 X線 | 13 レジスト | 16 現像後のレジスト |

第 3 図



- | |
|----------------|
| 17 フレネルゾーンプレート |
| 18 薄膜 |
| 19 2次元走査機構 |
| 20 X線検出器 |
| 21 データ処理装置 |